

FREEZE-DRIED VACCINE FOR HEPATITIS A

Patent Number: JP1279843
Publication date: 1989-11-10
Inventor(s): MORITSUGU YASUO; others: 04
Applicant(s): YASUO MORITSUGU; others: 03
Requested Patent: JP1279843
Application Number: JP19880106749 19880428
Priority Number(s):
IPC Classification: A61K39/29 ; A61K9/14 ; A61K47/00
EC Classification:
Equivalents: JP2042887C, JP7061955B

Abstract

PURPOSE: To obtain the subject vaccine resistant to the lowering of titer, having excellent storage stability and quickly soluble in use, by purifying a virus obtained by tissue culture, inactivating the product and freeze-drying in the presence of a stabilizing agent.

CONSTITUTION: A large amount of hepatitis virus A (HAV) is produced by the tissue culture using (A) GL-37 cell capable of highly producing HAV and established from the cultured kidney cell of African green monkey by cloning using a colony culture method and (B) an HAV strain KRM 003 strain separated from the feces of hepatitis A patient and having excellent sensitivity to the above cell. The obtained HAV is highly purified, inactivated, added with a stabilizing agent and freeze-dried. The stabilizing agent is 0.1-2.0% (W/V) of an amino acid such as glycine, alanine or lysine or their salt, 0.1-15% of sugars such as glucose, lactose or mannitol and 0.01-0.1% of a gelatinizing agent such as gelatin or human albumin.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

平1-279843

⑫ Int. Cl. *

A 61 K 39/29
9/14
47/00

識別記号

316

庁内整理番号

8829-4C
D-7417-4C
J-7417-4C

⑬ 公開 平成1年(1989)11月10日

特許請求の範囲 未請求 請求項の数 6 (全5頁)

⑭ 発明の名称 混合乾燥A型肝炎ワクチン

⑮ 特 領 昭63-106749

⑯ 出 領 昭63(1988)4月29日

特許法第30条第1項適用 昭和62年11月5日、「第35回日本ウイルス学会総会」において文書をもつて発表

| | | |
|---------|--------------|----------------------|
| ⑰ 発 明 者 | 森 次 保 雄 | 東京都八王子市台町1-14-23 |
| ⑱ 発 明 者 | 戸 塚 政 子 | 東京都昭島市玉川町5-16-2-107 |
| ⑲ 出 領 人 | 森 次 保 雄 | 東京都八王子市台町1-14-23 |
| ⑳ 出 領 人 | デンカ生研株式会社 | 東京都中央区日本橋兜町12-1 太洋ビル |
| ㉑ 出 領 人 | 千 葵 県 | 千葉県千葉市市場町1丁目1番地 |
| ㉒ 出 領 人 | 財団法人化字及血清研究所 | 熊本県熊本市清水町大塚668番地 |

㉓ 代 理 人 弁理士 简 井 知
最終頁に続く

Hypophosphorylated hepatitis A vaccine

明細書

1. 発明の名称

混合乾燥A型肝炎ワクチン

2. 特許請求の範囲

- (1) 通常培養により得られたウイルス液を精製し、不活化した豚血に安定化剤を添加し、混合乾燥して得られるA型肝炎ワクチンの混合乾燥剤。
- (2) 安定化剤としてアミノ酸またはその塩、及び醣を添加する特許請求の範囲第(1)項記載の製剤。
- (3) 安定化剤としてアミノ酸またはその塩、醣及び脂質を添加する特許請求の範囲第(1)項記載の製剤。
- (4) アミノ酸またはその塩が、グリシン、アラニン、グルタミン酸ナトリウム、アルギニン及びリジンから選ばれる少なくとも1種である特許請求の範囲第(2)項記載の製剤。
- (5) 脂質がグルコース、キシロース、ガラクトース、フラクトース、ラクトース、マルトース、オガロース、マンニット、ソルビット及びキシリットから選ばれる少なくとも1種である特許請求の範囲

3. (2)項記載の製剤。

- (6) 脂質がビラナン、ヒトアルブミンまたはデキストランである特許請求の範囲第(1)項記載の製剤

3. 発明の詳細な説明

本発明は、A型肝炎ワクチンの混合乾燥剤に関する。さらに詳しくは、通常培養により得られたウイルスを精製し、不活化後、安定化剤の存在下で液体乾燥を行うことを特徴とするA型肝炎ワクチンの混合乾燥剤を提供するものである。

4. 前の文書

A型肝炎は、A型肝炎ウイルス(以下、HAVと略す)によって起こり、女子的にも、器質的にも非常に重要な感染症であり、いまだ有効な治療対策が見い出されていない。そのため、このようなA型肝炎に対してしばらく予防法が抜けされており、現在はグロブリン剤を1~3ヶ月おきに投与することが行われている。しかし、グロブリン剤中の抗HAV抗体価の低下の問題や回復後の必要性のため、ワクチンの開発が図られてきたが、まだ実用化されるまでには至っていない。

ところで、A型肝炎ワクチンは、HAVの常在地盤への侵入者の感染を防止する効果を有していると共に、世界中いたるところで起こる散発性A型肝炎の二次感染を防止する効果を有している。これらの背景から、A型肝炎ワクチン製剤は日本国内はもとより、広く世界各地において使用可能であることが必要である。すなわち、安定性がすぐれ、長期保存に充分に耐え得る製剤の提供は必須の条件である。

本発明者は、A型肝炎患者の尿便より創立されたHAV株XRN003株とHAV感受性細胞を用いた組織培養によるウイルスを原料としてワクチンの開発を試みてきた。(第33回日本ウイルス学会年会 257頁、(1985))

通常、液状ワクチンには防腐剤が加えられており、一般的には広い抗菌スペクトルを有するナメロナールが加えられている。ところが、本発明者はワクチン開発中に、液状HAV抗原にナメロナールを加えるとHAV抗原活性が低下する現象を見い出した。(第35回日本ウイルス学会年会 234頁、

(1987)) さらに、あらかじめ液状HAV抗原にエチレンジアミン四酢酸(以下、EDTAと略す)を加えておくと抗原活性の低下が抑えられることより、前述の現象はナメロナール中の2価の水素イオンに起因するものと察せられた。しかしながら、EDTA添加はある程度効果は認められるものの完全ではなく、また、EDTAの添加は注射時に痛みを伴うことより、純EDTAを含まない既存防腐剤が好ましいと察せられた。しかし、通常の液状製剤にみられるような条件下でその主な防腐処理を行うと、既存の防腐剤において効率が低下する欠点が生じることが判明した。

第四の目的

本発明者は、上記のような問題点を解決すべく既存技術を踏まえた結果、抗原活性の低下や性状の変化を伴わずに液状化能することを可能ならしめ、かつ既存品の保存安定性も液状ワクチンに比して飛躍的に良好となる液状化能の条件と、安定化のための防腐の配合構成とを見い出すことにより本発明を完成した。

第四の開発上に努力

本発明に用いるA型肝炎ウイルスは、組織培養より得られたウイルスが使用される。HAVは長い間培養細胞で増殖出来なかつたが、1979年に至りようやくProvostとHilleman(Provost, P. J. et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 159, 213, (1979))による初の成功が報告された。彼らはムネアカハラタマリンを使ってHAVの培養を行い、肝臓から抽出したウイルスをムネアカハラタマリンの肝臓の培養切片に接種し、初めてHAVが増殖するのを確かめるとともにアカゲザルの胎児の肝臓実験(ERhK6)でも増殖することを見出した。その後世界各地でいろいろな培養細胞を用いて追試された結果、直先生肝癌由来の培養細胞(Alexander hepatoma cell) (Frosner, G. G. et al., Infect. Z., 303, (1979)), Vero細胞(Locarnini, S. A. et al., J. Virol., 32, 216, (1981)), アフリカミドリザル肝細胞(Deeher, R. J. et al., Infect. Immun., 33, 388, (1981))などでも増殖することが確かめられた。本発明者は、アフリカミドリザル

肝細胞培養よりコロニー培養法によるクローニングによって創立されたHAV高感受細胞株GL-37細胞と、同じくA型肝炎患者の尿便より分離しGL-37細胞に感受性のすぐれているHAV株XRN003株を用いた組織培養により、大量にHAVを得ることができた。

上記の方法により得られたHAVは、ポリエチレングリコール分離、超遠心、有機溶媒処理、酵素処理、グルコサミンの生物学的活性物質の分離精製に用いられる方法の組合せにより、高度に精製して精製品とし、ホルマリンにて不活化した後、本発明の液状化能ワクチン製剤化に供する。

得られた不活化HAV抗原精製品を用い液状化能に供するには、中性付近の適当な濃度のバッファー(例えば0.01Mリン酸バッファー)中で、また好ましくはTween 80を0.302V/Vになるよう添加したバッファー中で、HAVおよび各添加物質の組成が次のようになるよう調整される。

すなわち、HAV抗原は蛋白質濃度として0.05V/V以下、好ましくは0.002V/V以下含有される。添加される不活化剤としては、アミノ酸類より形成

日本にエナジ
ーする)を加
へることより
アスコイオン
が、
の完全では
みを伴うこ
用が好まし
貴君にみら
を庁うと、
それが生じる

を解決すべ
王下や性状
可能なうし
手に比して
変化のた
により本児

・ローニン
CL-37組合
しCL-37組
合を用いた
「できた。」
リエナレン
ル、昇常通
一成員間に
賃貸して
た後、本
・
ハ復讐兎無
バッファ
ル、また好
き加減した
り組合が次
0.05%Y83
いる。追加
上げる額

の一方または併せしくは双方が含まれる。アミノ酸としてはグリシン、アラニン、グルタミン酸、ナトリウム、アルギニン、リジンなどのアミノ酸またはそれらの塩が挙げられ、それらの1種もしくは2種以上を用い、通常0.1~2.0%程度、連結時に供するHATU或はDCC液中に存在させる。

母核としては、グルコース、キシロース、ガラクトース、フラクトースなどの单糖類、ラクトース、マルトース、ツァカロースなどの二糖類、マニニット、ツルビット、キシリットなどの耐アルコール糖が挙げられ、これらの1種もしくは2種以上を用い、濃度0.1~15%V/V程度は存在させる。また酵母類としてはビラナン、ヒトアルブミン、デキストランなどが挙げられ、濃度0.01~0.1%V/V程度まで存在させる。

さらに皮脂花崗ウツチの使用時、溶解した時に生ずるに溶解となるようするため中性脂を配合する。中性脂としては硬化ナトリウム、硬化カリウム、硬化マグネシウムが含まれるが、配合には硬化ナトリウムでこれに適宜、上記他の中性

さうに詳細に説明する。

SOMI HAVOK

CL-37細胞を10V/VX牛血清添加イーグル-E-NEM培地で7日培養後、細胞シートを浮遊させ、0.01Mリン酸バッファーで洗浄後、0.05M/VXトリプシン、0.02M/VX EDTA追加0.01Mリン酸バッファーにて細胞をはがし、牛胎児血清（以下FBSと略す）を追加し、1000rpmで3分間遠心してトリプシン液を除く。細胞沈淀を8V/VX FBS添加E-NEM培地にて浮遊させ、この浮遊液に4.0.1.（細胞当たりのウイルス量倍）0.1になるように用ウイルス液を添加させ、37°C1時間後洗浄8V FBS添加E-NEM培地を加えて3~4日並殖し、3回培養する。

この同じ週間に1回、2V/V₁ FBS添加E-MEN培地にて培地交換を行う。3週間後、培地を吸引除去し、残りにて0.01Mリン酸バッファーにて2回細胞を洗浄後、1V/V₁ NP-40（牛糞化学社製）を含む可溶化液をローラーボトル1本（容量約28）当たり15ml加入し37°C1時間反応させ、HAV感染細胞を可溶化する。可溶化液を3000rps、30回分離心し、上清を濾過する。

量が増加される。これらの中性塩は0.1~3M/V/V程度、濃度0.5~2M/V/V程度の濃度で含まれる。亜鉛乾燥に供すべく封入されたワクチン液は、所定の包装単位に従い通常0.1ml~10mlのHAT抗原を含むように小分容器に分注する。この分注量は、各回次は乾燥または恒温恒湿乾燥し、恒温恒湿貯蔵とする。恒温乾燥の条件としては、例えば-50°C、蒸圧にて予備乾燥を6時間行い、次に圧力を0.003 Torr に下げ、設定温度を-15°Cから0°Cに段階的に上げ、50時間1次乾燥を行う。この時点での貯蔵温度は0°C程度である。次に25°C設定温度にて圧力0.003 Torrで20時間2次乾燥を行う。

この直接免疫測定は、その組成として少なくとも
し組成は黄疸HAB抗体、安定化剤、中性脂を含
する。

かくして得られた実用性は、力性の低下がなく、その保存安定性がよく、使用時の溶解性が速々かで低めて優れたアセチルセルロースの実用性が得られる。

以下、本研究の結果を総合的に評議により

この上流域にはHAW流量が3~6m³/sの場合は多く
れでいる。

2342 1137093

上記上清液に疎水性成分が70%以上になるようにポリエチレングリコール6000(和光純薬社製)を加えて4℃に立く。一夜後にこのポリエチレングリコール添加溶液を8000rpmで30分同速心し上清を捨て、沈淀に1V/YEXP40を含む可溶化バッファーを加えて再懸滴し、HAV抗体を回収する。さらに、このHAV抗体液を25000rpm・16時間同速心し上清を捨て、同培養時の1/5~1/10量の0.01Mリン酸バッファーを加えて沈淀を完全に再溶解し、4℃に一夜立く。次に粗骨格処理し、15000rpm・15分同速心し上清を取める。この上清には通常15~60mg/mlのHAV抗体が含まれる。この上清に等量のクロロホルムを加え室温で15~30分同様に処理する。2000rpm・30分同速心し、上層にある水溶液を速め早く複数しながら減圧吸引して残存するクロロホルムを除去する。

さらに経過で 20mM / ml の RNase A (シグマ社製) を加え、37°C、1 時間処理し、次に SDS 搾化マグネ

シウムと20~40μg/mlのDilase I(宝酒造社製)を加えて37°Cで3時間処理する。その後、50μg/mlになるようProteinase K(メルク社製)を加えてさらに37°C、1時間処理する。2.5Mリソバッファー(pH 7.5)、エトキシエタノールとブトキシエタノールの2:1混液をそれぞれ1ml及び0.8ml加え軽く混和し、2000rpm 10分間遠心し上清液を取り。2mM EDTA、0.002% Tween 80(和光純薬社製)追加0.01Mリソバッファー(pH 7.4)で200~300μg/mlのHIV液になる様に溶解する。このHIV液を凍結乾燥処理操作を1~2回繰り返す。この溶液をセファクリルS4000HS(ファルマシア社製)によるゲルろ過により最終精製液を導く。最終精製液濃度は50~100μg/mlの濃度であり、TCA(トリクロロ酢酸)ローリー法にて測定した全蛋白量に対するHIV液濃度と蛋白量の割合は70~100%を示す。

実験例3 不活化

HIVウイルス液を0.002%V/V Tween 30及び0.14M塩化ナトリウム濃度0.01Mリソバッファー(pH 7.5)にてウイルス消失が20μg/mlになる様に希釈

中のHIV液の力値をELISA法により測定し、測定後の抗原力値を1とした時の抗原力値の相対値で示した。結果を第1表に示す。

第1表

| 溶液組成 | 抗原力値変化 | | | |
|----------------------------|--------|------|------|------|
| | 3日後 | 5日後 | 7日後 | 11日後 |
| PBS-T | 0.91 | 0.77 | 0.69 | 0.60 |
| PBS-T+0.01%V/Vナメロナール | 0.26 | 0.09 | 0.04 | - |
| PBS-T+2mM EDTA+0.01%ナメロナール | 0.37 | 0.56 | 0.44 | 0.27 |

PBS-T: 0.002%V/V Tween 30, 0.14M塩化ナトリウム追加
0.01Mリソバッファー(pH 7.5)

実験例2

実験例3で測定したウクナン液を2mlバイアルに0.5mlずつ分注し、様々な温度で凍結乾燥を行い、37°Cにおける保存安定性試験を実施した。結果を第2表に示す。

して無菌ろ過する。0.002%V/V Tween 80追加0.01Mリソバッファー(pH 7.5)を用い1:2000希釈したホルマリンと等量混合し37°Cに12日間置く。途中8日目と12日目終了後には再び無菌ろ過する。不活化を完了したウイルス液は4°Cに保存する。

実験例4 不活化

実験例3で測定した不活化精製液に、アミノ酸として0.1%V/Vアルギニン濃度と0.1%V/Vグルタミン酸ナトリウムと、などとして5%V/Vラクトースと1%V/Vソルビットを頭コロしてHIV液濃度が最終的に1mg/mlの濃度になるように0.002%V/V Tween 30追加0.01Mリソバッファー(pH 7.5)にてウクナン液を調製した。このウクナン液1.5mlを2mlバイアルに入れ、-50°C圧縮にて6時間予凍結乾燥圧縮力を0.003Torrに下げ、設定は文を-15°Cから4°Cに段階的に上げて50時間1次乾燥し、次いで4°Cにて圧力を0.003Torrで10時間2次乾燥して最終乾燥品を得る。

実験例5

実験例3で測定した不活化精製液を瓶詰にて37°Cにおける保存安定性試験を実施した。結果

第2表

| 保存温度 | 抗原力値変化 | | | | 抗原力値変化 | |
|------|----------|---------|---------|----------|--------|------|
| | 直射日光3日後 | 直射日光5日後 | 直射日光7日後 | 直射日光14日後 | | |
| ① | 1.00 | 0.16 | X | ○ | 0.02 | - |
| ② | 1.00 | 0.70 | ○ | ○ | 0.37 | 0.33 |
| ③ | 1.00 | 0.92 | ○ | ○ | 0.70 | 0.36 |
| ④ | 0.51ビラナン | | | | | |

① PBS-T

② PBS-T+5%ラクトース+0.5%アルギニン+0.5%グルタミン酸ナトリウム

③ ○+0.5%ビラナン

実験例6

実験例4に記したものと同様の方法によって得られた凍結乾燥品の、保存安定性試験を実施した。凍結乾燥後の抗原力値を1とした時の抗原力値の相対値で示した。結果を第3表に示す。

第3表

| 保存温度 | 抗原力値変化 | | | | | |
|------|--------|------|------|------|-------|-------|
| | 1週間後 | 3週間後 | 5週間後 | 9週間後 | 13週間後 | 17週間後 |
| 25°C | 0.99 | 1.15 | 0.98 | 1.16 | 1.12 | NT* |
| 37°C | 0.91 | 0.90 | 0.54 | 0.30 | 0.75 | 0.64 |
| 45°C | 0.90 | 0.63 | 0.62 | 0.60 | 0.54 | NT* |

* not tested

1-279843(4)

13回後 0.01

13回後を試した
結果多く、途中
も止まる。不活性
する。

次に、アミ
ノ酸と、LV/VG
でELISAラクトー¹⁷活性が最高的
のTg: Tween 80
にてワクチン
を200倍バイア
スは圧力を
0から10まで段階
で10まで圧力
を変化する。

活性を液状に
測定した。得液

実験用

②オ例3で得られたワクチン液と②オ例4で
測定した液は免疫ワクチンをDDYマウスを用いて先
に活性を比較した。HAV抗体量200μg、100μg、50μg、
15μgの接種量で各10匹ずつのDDYマウス腹腔内に接
種した。6週間後採血し、その血清について、既HAV
抗体をHAV抗原アレートとバーオキシダーゼラベル
法とELISA法を用いた場合抑制ELISA法によ
り測定した。その結果を第4表に示す。

各抗体接種における測定結果の場合の平均抗体
活性を1としたときの免疫活性ワクチン接種の場合
の平均抗体活性の相対活性の平均で示した。

第4表

| | 相対活性 | 範囲(%) |
|----------|------|-----------|
| ワクチン液 | 1.00 | 0.57~2.51 |
| 免疫活性ワクチン | 1.24 | |

代理人 律士 篠井

第1頁の続き

②免 明者 佐 深 征 他 新潟県新潟市秋葉3-18-5
 ②免 明者 森 田 達 夫 千葉県千葉市千城台東1-10-4
 ②免 明者 水 野 浩 介 熊本県熊本市荒田町上立田1725-1

| 抗体活性化 | | |
|-------|------|------|
| 1回後 | 13回後 | 17回後 |
| 0.92 | - | - |
| 1.17 | 0.33 | 0.79 |
| 0.70 | 0.56 | 0.50 |

グルタミン酸ナトリウム

方法によって得
活性を測定した。
の抗体活性の相
対活性。

| 活性化 | | |
|------|------|------|
| 1回後 | 13回後 | 17回後 |
| 1.16 | 1.12 | NT* |
| 80 | 0.75 | 0.64 |
| 50 | 0.54 | NT* |